

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200334013

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

苯并(a)芘和 Aroclor1254 对真鲷 (*Pagrus major*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的胚胎和仔鱼及其基因的毒性效应

Toxicological effects of BaP or Aroclor1254 on the embryos and fries of *Pagrus major* and *Lateolabrax japonicus*

黄叔卓

指导教师姓名: 王克坚 教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2006 年 11 月

论文答辩时间: 2006 年 11 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____ 郑微云 _____

评 阅 人: _____ 邵宗泽 _____

2006 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明（签名）：黄叔卓

2006 年 11 月 25 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（☒）

（请在以上相应括号内打“”）

作者签名：黄叔卓

日期：2006 年 11 月 25 日

导师签名：王克坚

日期：2006 年 11 月 25 日

摘 要

迄今研究证明, hepcidin 的诱导表达与病原菌感染或者铁代谢调节有关, 有机污染物是否可以诱导 hepcidin mRNA 的表达尚未见报道。而鱼类 P4501A 基因的诱导表达已被作为暴露于持久性有机污染物的早期预警信号。本文以持久性有机污染物的代表 BaP 和 Aroclor1254 为受试物, 以海水养殖花鲈和真鲷的胚胎和仔鱼为实验材料。观察了不同 Aroclor1254 浓度、不同时间处理下的胚胎形态学变化。进一步用分子生物学方法研究了与污染物诱导相关 P4501A 和 hepcidin 基因的表达变化。实验获得了如下结果:

- 1、Aroclor1254 对花鲈和真鲷的胚胎具有致畸性和神经毒性。观察了不同 Aroclor1254 浓度 (1、1.5、2.25、3.8、5.1、7.6、11.4、17.1、25.6 和 38.4 $\mu\text{g/L}$)、不同时间 (4h~72h) 处理下的胚胎形态学变化, 致畸性表现在由 3.8~25.6 $\mu\text{g/L}$ Aroclor1254 处理后出现尾畸、颅面发育不全、围心腔水肿、仔鱼脊柱弯、心率缓慢和泳动迟缓等病理现象。神经毒性表现为仔鱼肌震颤、心脏单位时间搏动减缓等现象。
- 2、利用 RT-PCR 方法检测 Aroclor1254、BaP 暴露对真鲷胚胎和仔鱼的 P4501A 和 hepcidin 基因表达的影响。实验结果表明, 在不同 BaP 浓度 (0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g/L}$) 诱导下, 真鲷仔鱼孵出 24h、48h 以及 72h 三个时间段都扩增到 hepcidin 条带和 P4501A 条带, 说明在孵出 72h 内的仔鱼体内已有 hepcidin 基因和 P4501A 基因存在, 并且在三个染毒浓度的 BaP 暴露下, 各组目的基因表达强度都略高于未染毒对照组。同样在 Aroclor1254 的诱导下, 都能扩增出 P4501A 条带和 hepcidin 条带。
- 3、利用 Northern blot 方法检测了 BaP 诱导下 P4501A mRNA 和 hepcidin mRNA 的表达。Northern blot 检测未表现阳性结果, 提示在本项研究中, 染毒后仔鱼的 P4501A mRNA 和 hepcidin mRNA 表达丰度不高。
- 4、该项研究初步证明环境污染物 BaP、Aroclor1254 对真鲷抗菌肽 hepcidin 基因有诱导效应, 推测环境污染物引起鱼类的毒理学效应与其免疫有关联。

关键词：真鲷；鲈鱼；胚胎；仔鱼；BaP；Aroclor1254；P4501A；hepcidin

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

It is known that the antimicrobial peptide hepcidin gene expression increases in response to iron metabolism, inflammation and bacterial infection, but none has been reported that hepcidin expression could be induced at the exposure of the environmental pollutants. In monitoring contamination in aquatic systems, induction of the P4501A gene of fish has been evaluated as a sensitive “early warning” method. In this study, changes of embryos morphology were observed from 24 to 72 hours postfertilization(hpf) following water borne exposure of various concentration of Aroclor1254. A relationship between hepcidin, P4501A expression and the response induced by environmental pollutants was investigated in embryos or fries of *Pagrus major*. The toxicological response of BaP and Aroclor1254, respectively, was primarily evaluated by a RT-PCR and hybridization method. The following results were obtained:

1. This testing technique demonstrated that BaP and Aroclor1254 can respectively induce embryos teratogenesis and neurotoxicity. After fertilization, embryos were observed and screened during the whole developmental process. Crooked vertebrae, the short lower jaw, pericardial edema malformation, pericardial edema, blood stream stagnation and others were found on the embryos in 3.8~25.6 µg/L Aroclor1254 and 0.1~2.5 µg/L BaP. Also with nervous signs before death, such as higher residual ozone levels.
2. RT-PCR analysis of P4501A and hepcidin gene expression in embryos, fries of *Pagrus major* at the exposure of the Aroclor1254, BaP. Results showed that strong signals of hepcidin mRNA and P4501A mRNA expression were detected during the exposure time course of 24h, 48h and 72h, at different BaP concentrations (0.1, 0.5, 2.5 µg/L), indicating that BaP induced the hepcidin gene and P4501A gene expression in the fries of *Pagrus major*, while control expression was detected lower. Meanwhile, clear signals of hepcidin mRNA and P450 mRNA were also

observed at Aroclor1254 concentrations (1,1.5,2.25,3.8,5.1,7.6,11.4,17.1,25.6, 38.4 µg/L) and in the exposure time course (24h、48h and 72h) .

3. Using Northern-blot assay to detect the induction of BaP on P4501A mRNA和 hepcidin mRNA level in *Pagrus major* fries. However, no signal was detectable in the fries using Northern-blot assay, suggesting that the hepcidin and P4501A transcripts were not highly induced and expressed.
4. The study suggests that the environmental pollutant such as BaP and Aroclor1254 could induce the expression of the hepcidin gene in the embryos and fries of *Pagrus major*, indicating that the toxicological effects might be related with nonspecific immune response .

Key words: *Pagrus major*; *Lateolabrax japonicus*; embryos; fries; BaP; Aroclor1254; P4501A; hepcidin.

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
P450	cytochrome P450	细胞色素 P450
EROD	7-ethoxyresorufin-O-deethylase	7-乙氧基异吩恶唑正脱乙基酶
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase	禽类成髓细胞瘤病毒反转录酶
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物信息中心
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙脂
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene diamine teraacetic acid	乙二胺四乙酸
TAE	Tris-acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液
kDa	kilodalton	千道尔顿
bp	base paire	碱基对
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液

目 录

第一章 前言	1
第一节 PCBs 和 PAHs 对海洋鱼类毒害的研究进展	1
1 PCBs对海洋鱼类毒害的研究进展	1
2 PAHs对海洋鱼类毒害的研究进展	5
第二节 P450的研究进展	9
1 P450的主要生物功能	9
2 影响P450表达的因素	10
3 P450 与污染物的关系	11
4 前景与展望.....	12
第三节 抗菌肽研究进展	13
1 抗菌肽的分类.....	13
2 抗菌肽的生化特点.....	14
3 抗菌肽的生物学功能.....	15
4 抗菌肽的抗菌作用机理.....	15
5 Hecpidin 在铁代谢调节中的作用	17
6 前景与展望.....	19
第二章Aroclor1254对鲈鱼和真鲷胚胎-仔鱼毒性效应	20
第一节 Aroclor1254 对鲈鱼胚胎-仔鱼毒性效应	20
1 材料.....	20
2 方法.....	20
3 结果.....	22
4 讨论.....	25
5 小结.....	25
第二节 Aroclor1254 对真鲷胚胎-仔鱼的毒性效应.....	26
1 材料.....	26
2 方法.....	27
3 结果.....	30
4 讨论.....	31
第三节 小结.....	33

第三章 BaP 诱导下真鲷仔鱼 P4501A 和 hepcidin 基因的表达.....34

1 材料.....	34
2 方法.....	35
3 结果.....	44
4 讨论.....	47

第四章 研究结论49

参考文献51

致谢

Contents

Chapter 1 Introduction.....	1
Section 1 PCBs and PAHs toxicity to marine fish	1
1 Review of PCBs toxicity to marine fish	1
2 Review of PAHs toxicity to marine fish	5
Section 2 Review of P450	9
1 Main biological functions of P450.....	9
2 Influencing factors induced P450	10
3 The relationship between P450 and contamination	11
4 Expectation	13
Section 3 Review of antibacterial peptides	13
1 Biochemical structure of antibacterial peptides.....	13
2 Biological functions of antibacterial peptides.....	15
3 Antibacterial mechanism of antibacterial peptides	15
4 Hepcidin in iron metabolism.....	17
5 Expectation	19
Chapter 2 Toxic effects of Aroclor1254 in embryos and fries from	
<i>Pagrus major, Lateolabrax japonicus</i>	20
Section 1 Toxic effects of Aroclor1254 in <i>Lateolabrax japonicus</i>	
Embryos	20
1 Materials.....	20
2 Methods.....	20
3 Results	22
4 Discussion	25

5 Summarization	25
Section 2 Toxic effects of Aroclor1254 in Pagrus major embryos.....	26
1 Materials.....	26
2 Methods.....	27
3 Results.....	30
4 Discussion	31
Section 3 Summarization.....	33
Chapter 3 Gene expression of Hepcidin and P4501A of <i>Pagrus major</i>	
fries induced by exposure to BaP	34
1 Materials	34
2 Methods.....	35
3 Results.....	44
4 Discussion	47
Chapter 4 Conclusions and perspectives	49
References	51
Acknowledgements	

第一章 前言

第一节 PCBs 和 PAHs 对海洋鱼类毒害研究进展

海洋环境中主要持久性有机污染物为多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs) 等。持久性有机污染物的共同特点是难降解, 它们在水体中的含量虽不高, 但因在水体中残留时间长, 有蓄积性, 可导致慢性中毒, 造成致癌、致畸、致突变等毒害。鱼类是水环境中的重要生物种类, 是人类优质蛋白质的重要来源之一, 因此鱼类体内富积的污染物是人体内持久性有机污染物一个重要的来源^[1]。

1 PCBs对海洋鱼类毒害的研究进展

PCBs 是一类以联苯为原料在金属催化剂作用下, 高温氯化生成的氯代芳烃, 分子式为 $(C_{12}H_{10})_nCl_n$, 根据氯原子取代数和取代位置的不同共有 209 种同类物。商品 PCBs 多依据含氯量的不同来命名, 如 Aroclor1221、1242、1254 等, 12 代表联苯环的 12 个碳原子, 21、42、54 分别代表混合物中的平均含氯量。PCB 的同属物之间不仅其物理化学性质具有一定的差别, 而且其毒性机理也具有很大的不同。某些 PCB 化合物在总量上所占的比例并不大, 但可能是 PCB 毒性的主要来源^[2]。在这些同属物中, 一般以无邻位取代或仅有一个邻位取代, 具有对位及至少一个间位取代的作用最大。在 PCB 同属物中以具有 3-甲基胆蒎型 (3-Me-type) 诱导功能的毒性最强, 其次是具有 3-甲基胆蒎及苯巴比妥诱导型 (Mixed-type), 而具有苯巴比妥诱导功能 (PB-type) 的较弱。

1.1 海洋中的PCBs的来源及环境行为

PCBs 主要通过大气沉降和随工业、城市废水向河、湖、沿岸水体的排放等进入水体, 就世界大洋而论, 一般认为 PCBs 进入的途径是大气的输送, 大气中 PCBs 主要通过自制品、水中蒸发、陆源废物的焚烧以及工厂排放, 在环境中进行着大气和水之间的交换^[3]。作为疏水性化合物, 它在水中的主要存在方式, 除一小部分溶解外, 大部分的 PCBs 都是附着在悬浮颗粒物上, 这些悬浮颗粒物或者被水生生物所吸收, 通过生物链最终转移到沉积物中; 或者直接沉降进入底泥中, 并且最终将依照颗粒大小以一定的速度沉降到底泥中, 然后随之沉积下去。因此底泥中的 PCBs 含量一般要较上面的水体高一、两个数量级以上。如厦

门海域(包括九龙江口) 及闽江口海域沉积物中持久性有机污染物的分布^[4]。

1.2 PCBs对鱼类的毒害

1.2.1 PCBs在鱼体内的分布

PCBs可强烈地分配到生物脂肪中, 其在生物体不同部位的残留量随脂量的不同而异, 对PCB 的吸收积累在不同组织中有明显的差别。在含脂量高的脏器中, 含量明显要高, 在内脏和肌肉组织中积累较高, 鳃组织中积累较低^[5]。PCBs常在鱼的肝脏中富集, 许多例子观察到鱼卵的含量也很高, 这对鱼类的繁殖极为的不利。

进一步的研究表明PCBs在鱼体内脏PCBs浓度刚开始较高, 这是因为一方面它可通过鳃呼吸从水体中直接获得, 另一方面也可通过摄食水中悬浮物颗粒^[8]。食浮游植物性的鱼类后期内脏PCBs 浓度又有所增高, 因为水体中PCBs 含量与水体中叶绿素含量呈正相关。鱼体肌肉中PCBs 含量和内脏中含量表现出相似的积累过程, 初期积累速率虽没有内脏中快但仍表现出明显的积累。鱼鳃组织对PCBs 积累随时间延长变化不明显^[6]。

PCBs在鱼体内富集趋势可用生物富集系数BCFs (Bioconcentration Factors) 来描述, 是指有机化合物在生物体内或组织内的浓度与水体中浓度之比, 许多资料表明生物富集的机制实质上是有机化合物在脂肪—水体系中的分配过程, 生物对有机化合物的富集程度与生物体内脂肪含量成正比^{[7][8]}。

1.2.2 PCBs的急性毒性

PCBs急性毒性并不大, 亚急性、慢性中毒可导致鱼鳞损伤、游动异常和发育异常。聂湘平等^[9]报道Aroclor1254 对斑马鱼存活最大无影响浓度(NOEC)为0.40 $\mu\text{g/L}$, 最低有影响浓度(LOEC)为2.0 $\mu\text{g/L}$, 30 d 有效半致死浓度为5.09 $\mu\text{g/L}$, 对斑马鱼急性毒性不明显; 同时表现游动缓慢、食欲显著减退、体表及鳃丝粘液明显增多及鳃呈暗红的中毒特征。

黑头软口鲮鱼(Pimephales promelas)接触Aroclor1260 30d 其半致死量为3.3 $\mu\text{g/L}$, 与Aroclor1248 接触30 d 其半致死量为4.7 $\mu\text{g/L}$; 鳊鱼(Bluegill)和鲶鱼(Catfish)在PCB1248浓度达20–50 $\mu\text{g/L}$ 时数周死亡^[10]。己烯雌酚(DES)对稀有鮕鲫(Gobiop450ris rarus)生命早期暴露稀有鮕鲫死亡率升高, 生长发育迟缓, 鱼体内卵黄蛋白原(VTG) 的诱导明显^[11]。

1.2.3 PCBs 的致畸性

有文献报道^[12]受多氯联苯污染的幼年虹鳟鱼出现了肝组织损伤,胆管增生,肾上腺皮质组织的增生以及皮损伤,尤其是肝细胞中可见大量液泡和过氧化物酶颗粒体,并伴随有许多解体的破坏的内质网和线粒体以及一些沉淀物颗粒。同时鱼鳃组织受到明显损伤,鳃壳层肿胀并且有融合现象生损伤造成呼吸障碍,最终导致其死亡。

1.2.4 PCBs 的致癌性

PCBs是潜在的致癌物,能够导致细胞畸变而诱发癌症及造成多种发育障碍。这种毒性效应与PCBs氯含量及氯的取代位置有关,氯化程度高的致癌性强。其遗传毒性作用机制主要通过促进DNA加合物的形成、修复酶的活性下降及修复关键蛋白的错误表达等最终表现为癌变^[13]。

如 PCBs 使斑马鱼肝脏细胞出现异常特征,暗示其具有致癌性,暴露在 PCBs 处理组的斑马鱼肝脏细胞核呈多角形暴露,并有炎症性浸润;部分肝细胞细胞核萎缩变形并偏离中心,被挤至细胞边缘;细胞质中可见大量脂肪油滴及脂褐素;部分细胞质中线粒体内嵴脱落崩解,内质网断裂呈片段化^[14]。也与 Norrrgen、Engwall 等^[15] ^[16]在研究对肝脏的损伤时,对幼鱼进行注射后取肝脏进行超微结构观察得到同样的结果。

1.2.5 PCB 对新陈代谢的影响

PCB 从进入鱼体到排出体外对各相关器官都会造成危害。首先它进入血液运输到鱼体各处,对血液中电解质有影响,生物体中电解质的平衡是维持细胞内外渗透压及内环境稳定的必要条件,它一方面将直接影响其生理变化及健康状况,另一方面也反映了机体受有机污染物损伤的程度。习志群^[17]研究发现受 PCB 污染的鲫鱼,血清中 K^+ 、 Na^+ 的平衡受到了破坏, Na^+ 含量明显高于正常值, K^+ 含量低于正常值,推测可能是肝脏和肾脏受损。

肝脏为PCBs主要代谢场所,代谢途径主要是通过脱氯为相应的酚,但是在机体内代谢活性相对较低。PCBs会对生物肝脏产生损伤,诱导肝脏解毒系统的活化(如MF0,多功能混合氧化酶系统)。正常环境中,生物体内混合功能氧化酶的活性是相对较低的,活性可被PCBs诱导,导致活性异常增高,并与环境中特定污染物浓度之间存在着定量响应关系。此外,肾脏是PCBs代谢物的排泄通道,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库